DOI:10.11931/guihaia.gxzw202410006

热形态建成中 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录

冯雨[1,2,3]，刘周莉[1,2,3]，王昕[1,2,3*]

（1. 沈阳大学 生命科学与工程学院，沈阳 110044；2. 东北地质科技创新中心，沈阳 110000；3. 自然资源部黑土地演化与生态效应重点实验室，沈阳 110000）

摘　要：*SAUR*（*SMALL AUXIN UP RNA*）基因家族是促进下胚轴伸长的重要下游基因，然而在高温诱导的下胚轴伸长中 *SAURs* 受调控的分子机制尚有很多不明之处。热形态建成被定义为高等植物在最适温度和逆境高温之间的温和高温范围内发生的一系列形态变化。其中，高温诱导的下胚轴伸长是研究得最为透彻的一个。该研究以拟南芥 Col 野生型，*hy*5 突变体，35*S*::*HY*5-*HA*/Col-0 过表达植物和烟草为材料，采用 NPA 处理实验，定量RT-PCR，染色质免疫共沉淀和双荧光素酶报告基因检测的方法探索了高温调控*SAUR*1/2/3/4 的分子机制。结果表明：（1）热形态建成信号转导通路中生长素处于 HY5（ELONGATED HYPOCOTYL 5）的下游。（2）在 20 ℃和 29 ℃中 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录。（3）在常温和高温中 HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 的启动子区染色质含有 E-box 的部分结合，且这些结合被高温所抑制。（4）HY5 对 *SAUR*1/2/3/4 的调控依然需要生长素的参与。综上认为，高温通过影响 HY5 与 *SAUR1/2/3/4* 启动子染色质的结合强度来调控这四个基因的转录，并且此调控过程需要生长素。该研究为高温调控下胚轴伸长下游基因的分子机制提供了新的见解。

关键词：热形态建成，高温诱导的下胚轴伸长，HY5，*SAURs*，转录调控

中图分类号：Q943　　　　　　　　　　　　**文献标识码**：A

HY5 inhibits the transcription of *SAUR*1/2/3/4 in thermomorphogenesis

FENG Yu[1,2,3], LIU ZhouLi[1,2,3], WANG Xin[1,2,3*]

(1. *College of Life Science and Engineering, Shenyang University*, Shenyang 110044, China; 2. *Northeast Geological S&T Innovation Center of China Geological Survey*, Shenyang 110000, China; 3. *Key Laboratory of Black Soil Evolution and Ecological Effect, Ministry of Natural Resources*, Shenyang 110000, China)

Abstract: The *SAUR* (*SMALL AUXIN UP RNA*) gene family is an important downstream gene family that promotes hypocotyl elongation. However, the molecular mechanism by which *SAURs* are regulated in high temperature induced-hypocotyl elongation remains unclear. Thermomorphogenesis is defined as a series of morphological changes that occur in the mild high temperature range between the optimal temperature and the adverse high temperature in higher plants. Hypocotyl elongation is one of the most intensively researched one. In this study, Arabidopsis Col wild type, *hy*5 mutant, 35*S::HY*5-*HA*/Col-0 overexpressed plants and tobacco were used as research materials. NPA treatment, quantitative RT-PCR, chromatin immunoprecipitation and double luciferase reporter gene detection were used to explore the molecular mechanisms of high temperature regulated *SAUR*1/2/3/4. The results were as follows: (1) Auxin is downstream of HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) in the thermomorphogenesis signaling pathway. (2) HY5 inhibits the transcription of *SAUR*1/2/3/4 in 20 ℃ and 29 ℃. (3) HY5 binds to the E-box-containing regions of *SAUR*1/2/3/4 promotors chromatin, and these bindings are inhibited by high temperature. (4) Auxin is required for the regulation of *SAUR*1/2/3/4 by HY5. In summary, high temperature regulates the transcription of these four genes by affecting the binding strength of HY5 and *SAUR*1/2/3/4 promoter chromatin, and this regulatory process requires auxin. This study provides new insights into the molecular mechanisms of hypocotyl elongation downstream genes regulated by high temperature.

基金项目：辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC2203070)；辽宁省科技计划联合计划自然科学基金-面上项目(2024-MSLH-506)；中国地质调查局东北地质科技创新中心区创基金项目（QCJJ2022-44）；辽宁省博士科研启动基金项目（201601216）。

第一作者：冯雨（1997-），硕士研究生，主要从事植物抗逆分子机制的研究，（E-mail）738167787@qq.com。

*__通信作者__：王昕，博士，副教授，主要从事植物抗逆分子生物学的研究，（E-mail）xwang166@126.com。

Key Words: thermomorphogenesis, high temperature-induced hypocotyl elongation, HY5, *SAURs*, transcription regulation

随着全球变暖的持续加剧，高温将日益严重地危害全球植物的生存繁衍乃至农作物生产（Cox et al., 2020; Challinor et al., 2014）。当温度小幅度地超过最适区间时，植物能够通过形态变化来为自身降温，这个温度范围称为温和高温（Zhu et al., 2022）。但当温度超过一定限度时，植物通过自身的调整已无法克服高温的负面影响，从而导致植物生长发育停滞甚至死亡。这个温度范围称为逆境高温（Zhu et al., 2022）。模式植物拟南芥的最适温度为 20~22 ℃，温和高温为 23~29 ℃，逆境高温为 30 ℃以上。在温和高温范围内发生的形态变化被称为热形态建成（Quint et al., 2016; Quint et al., 2023）。在这些形态变化中，下胚轴伸长因其便于研究而成为了研究者们关注的焦点。

在热形态建成信号转导通路中，转录因子 HY5 和生长素发挥着重要的作用（Gray et al., 1998; Delker et al., 2014; Gangappa & Kumar, 2017; Lee et al., 2021）。HY5 是热形态建成的负向调控因子，抑制温和高温诱导的下胚轴伸长（Delker et al., 2014）。生长素是热形态建成的正向调控因子，促进高温诱导的下胚轴伸长（Gray et al., 1998; Kim et al., 2020; Bianchimano et al., 2023）。在最适温度中，HY5 与生长素合成基因 *YUCCA*8（*YUC*8）启动子区结合并抑制其转录，从而使生长素维持在较低的水平（Gangappa & Kumar, 2017）。在温和高温中，HY5 受到多方面的抑制。其中一个是 HY5 与 *YUC*8 启动子区的结合强度下降，导致 HY5 抑制 *YUC*8 转录的能力下降（Gangappa & Kumar, 2017），从而导致生长素合成量上升。值得注意的是，对 *YUC*8 表达的促进在转入温和高温 4 h 后达到峰值，在 8 h 或 24 h 显著降低（Sun et al., 2012; Huai et al., 2018）。这表明在最初受到高温胁迫的几个小时后，生长素的高敏感性可能在下胚轴伸长中发挥着主要作用（Pucciariello et al., 2018）。此外，HY5 与热形态建成的正向调控因子 PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4（PIF4）结合在 *YUC*8 启动子区的相同部分（Gangappa & Kumar, 2017）。但是，PIF4 与 *YUC*8 启动子区的结合强度被高温所增强，这说明这两个转录因子在结合 *YUC*8 启动子区时可能存在竞争关系（Gangappa & Kumar, 2017）。

AUXIN RESPONSE FACTORs（ARFs）是生长素信号转导通路中的转录因子。拟南芥中存在 23 个 ARFs，其中负责转录激活的包括 ARF5、ARF6、ARF7、ARF8 和 ARF19（Roosjen et al., 2018）。它们组成性地结合在许多生长素应答基因的启动子区，并促进其表达。当缺少生长素时，AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE（AUX/IAA）蛋白与这些 ARFs 发生相互作用，并将其从靶基因启动子拉下，从而抑制生长素应答基因的表达（Ito et al., 2016）。当生长素含量上升时，生长素被其受体 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1（TIR1）/ AUXIN SIGNALING F BOX PROTEIN（AFB）识别。受体与生长素的复合体促进 AUX/IAA 与 Skp1-Cullin-F-box（SCF）TIR1/AFB E3 泛素连接酶复合体结合，从而将 AUX/IAA 蛋白泛素化并降解（Maraschin et al., 2009）。这就造成了转录因子 ARFs 的释放，这些游离的 ARFs 激活生长素应答基因转录。因为 *SAUR* 基因家族是生长素激活基因，所以它们的表达很可能受到上述五个 ARF 转录因子的促进。*SAURs* 在促进植物生长和细胞伸长过程中发挥着重要作用（Ren & Gray, 2015）。其分子机制主要有两种：一、通过使细胞壁酸化来提高其延展性，从而促进拟南芥下胚轴细胞膨大，汇集到表型层面就表现为下胚轴伸长（Spartz et al., 2014; Wong et al., 2021）；二、通过与核糖体蛋白 RPL12 和 SAUR62/75 的结合，加强核糖体的组装和翻译，从而促进花粉管生长（He et al., 2018）。综上所述，在热形态建成中植物通过抑制 HY5 来解除生长素合成的抑制状态，从而提高植物生长素含量。

SAURs 具有促进植物生长和细胞伸长的作用（Ren & Gray, 2015），然而在高温诱导下胚轴伸长的过程中，高温调控 *SAURs* 的分子机制还不甚清楚。该研究以拟南芥和烟草为实验材料，主要采分子生物学的方法，拟探讨以下问题：（1）HY5 与生长素在热形态建成信号转导通路中的上下游关系；（2）HY5 是否调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录；（3）HY5 能否与 *SAUR*1/2/3/4 的启动子染色质区结合和结合的具体位置，（4）HY5 是否能够越过生长素来调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录。该研究关注了热形态建成中高温如何调控 *SAURs*，丰富了 HY5 的下游调控基因，进一步加深了对高温调控细胞伸长基因分子机制的认识。

1　材料与方法

1.1　实验材料

在该篇论文中，我们采用模式植物拟南芥作为植物研究材料。野生型采用 Columbia-0（Col-0）生态型，突变体采用 *hy*5，ChIP 实验采用 35*S*::*HY*5-*HA*/Col-0 转基因植物。这三种植物材料均来自中国科学院光生物学重点实验室。

1.2　植物培养条件

种子灭菌和幼苗培养均依照我们已发表的文章进行（Wang et al., 2015）。Quantitative Real-time PCR（qRT-PCR）和 Chromatin Immunoprecipitation（ChIP）实验使用的幼苗培养条件：持续白光 20 ℃下培养 6 d 后分别转入 20 ℃和 29 ℃培养 6 h。培养完成后，将整株幼苗放入液氮中并置于-80 ℃冰箱中待用。表型实验使用的幼苗均在 20 ℃和 29 ℃持续白光中培养 8 d。光照条件：持续白光，光强为 25 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$。

1.3　下胚轴拍照及数据处理

将基因型不同的幼苗置于同一平板上进行培养，并重复 3 次。拍照后在 Image-J 软件（http://rsb.info.nih.gov/ij）中测量幼苗的下胚轴长度。

1.4　拟南芥中 RNA 的提取

该文使用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（DP432）提取植物总 RNA，实验操作完全按照产品说明书进行。

1.5　RNA 的逆转录

在逆转录过程中，我们使用了天根生物 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒（KR116）对所获得的 RNA 进行逆转录。

1.6　Quantitative Real-time PCR（qRT-PCR）实验

该实验我们采用了天根生物的 SYBR 预混试剂盒，以 *UBQ*1 作为内参。PCR 引物组见表 1。

表 1　qRT-PCR 引物序列

Table 1　The primers sequences used for qRT-PCR

引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）	引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）
*UBQ*1-F	TTCCTTGATGATGCTTGCTC	*SAUR*2-R	GGCTTTACGCAACAAGGCTT
*UBQ*1-R	TTGACAGCTCTTGGGTGAAG	*SAUR*3-F	ACTTCAGGGCTTGTTCCGAA
*SAUR*1-F	TGATCGGACTCTCTCAGGCA	*SAUR*3-R	GGTATCGTCAAGCCACCCAT
*SAUR*1-R	GTACCCGACGTAGCCAAGAG	*SAUR*4-F	TGTCGCGTGTGATCAACTCT
*SAUR*2-F	GGAGAAGACGAGATGGAGACG	*SAUR*4-R	TCTCCGACATAAACCGCAACA

1.7　Chromatin Immunoprecipitation（ChIP）实验

该实验依照前人的研究方法进行（Jing et al., 2013）。在沉淀蛋白-DNA 样品的过程中我们使用了 HA 抗体或 IgG 血清。使用 qRT-PCR 为 DNA 定量（引物见表 2）。

表 2　ChIP-qPCR 引物序列

Table 2　The primer sequences used for ChIP-qPCR

引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）	引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）
*SAUR*1-F1	GGGTCAAGAGGTCACGAGGA	*SAUR*3-F1	TGTGTCTTAAACGCGATATCTTTT
*SAUR*1-R1	ACTTCATTATGTTCTAGAAAC	*SAUR*3-R1	AGCAACAAACCTTCACCCCT

*SAUR*1-F2	AGCCACCTTTGAGAGAAAGCA	*SAUR*3-F2	GGAGAAGACGAGATGGAGACG
*SAUR*1-R2	TGGGAACAAAAGCATCTGCA	*SAUR*3-R2	AGAATCTACCAACTGTATTAGTGCG
*SAUR*1-F3	AGCCACCTTTGAGAGAAAGCA	*SAUR*3-F3	GCAAATAGCTATAGATCTATGGGGA
*SAUR*1-R3	TTGTTTGTGGGGTGAGGCAT	*SAUR*3-R3	TGTTTGTTAAATTTTCAGCTCCATAGA
*SAUR*1-F4	AGGACAAGGCATAAGCATGTGA	*SAUR*3-F4	TGAGCTAAGCCATGTGAGCC
*SAUR*1-R4	TGCAAATGAGTAAGAAGGGAGA	*SAUR*3-R4	AAACAGTACGATGCGATATTTTGA
*SAUR*2-F1	GGAACCACAAACCTCTTCTTCTC	*SAUR*4-F1	TGGTTGAAAAATCCATCTTACAAAGA
*SAUR*2-R1	TCCAAACATAAATAAGAAGACATGGGT	*SAUR*4-R1	TGATGTAAGTCAGAGCTGGGT
*SAUR*2-F2	AGACAACGAGGGGAAGAAGT	*SAUR*4-F2	AGGATGGTGGATCACATGCA
*SAUR*2-R2	AGCTAAGCCATGTGAGCCAG	*SAUR*4-R2	TGATAAAATTGTGCAGTACTGTTTCA
*SAUR*2-F3	TCAGCTCCATAGATAGTTTTGATCA	*SAUR*4-F3	ATAAATAATGGAAATGAAACACGTGAC
*SAUR*2-R3	AGCCACAGTCACAATCATCCT	*SAUR*4-R3	TTAATCAGTTGAGTTAATATCACTGCT
*SAUR*2-F4	AAAATCATGCACTAATTAAGACTTCAC	*SAUR*4-F4	GCCACCATTTTCAAGAGCCA
*SAUR*2-R4	AGAATCTACCAACTGTATTAGTGCG	*SAUR*4-R4	AGTTTGCAGAGTTTCACATGGT

1.8 载体构建

使用 *pfu* DNA 聚合酶在野生型幼苗的基因组中扩增 *SAUR*1、*SAUR*2、*SAUR*3 和 *SAUR*4 启动子区（起始密码子 ATG 上游 2.0 kb 的 DNA 片段）（引物见表 3）。使用 *pfu* DNA 聚合酶在野生型幼苗的 cDNA 中扩增 *HY*5 的编码区（引物见表 1）。使用 DNA 测序确认无误后，将所得扩增片段插入 pEASY-Blunt 载体（TransGen），得到 pEASY-SAUR1p、pEASY-SAUR2p、pEASY-SAUR3p、pEASY-SAUR4p 和 pEASY-HY5。采用 TaKaRa MutanBEST kit 突变 HY5 结合的 *SAUR*1/2/3/4 启动子区中含有 E-box 的部分，获得 pEASY-SAUR1p（mut）、pEASY-SAUR2p（mut）、pEASY-SAUR3p（mut）和 pEASY-SAUR4p（mut）。将来自 pEASY-HY5（经 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切）的 HY5 编码区插入 pGreenII 62-SK 载体（经 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切）中产生 35*S*:*HY*5（在实验中作为效应基因使用）。通过 *Xho* I 和 *BamH* I 酶切 pEASY-SAUR1p、pEASY-SAUR2p、pEASY-SAUR3p 和 pEASY-SAUR4p 及其突变版本以获得启动子区片段，然后将这些片段插入 pGreenII 0800-LUC 载体（经 *Xho* I 和 *BamH* I 酶切），从而得到 *pSAUR*1:*LUC*、*pSAUR*2:*LUC*、*pSAUR*3:*LUC* 和 *pSAUR*4:*LUC* 及其突变版本（在实验中作为报告基因使用）。

1.9 双荧光素酶报告基因检测

瞬时启动子激活实验采用双荧光素酶报告基因检测法进行（Ji et al., 2021）。

1.10 数据分析

单因素方差分析采用 IBM SPSS Statistics 进行，采用 Duncan’s 多重比较检验数据间的差异。*表示差异达到显著水平（$P<0.05$），**表示差异达到极显著水平（$P<0.01$），也可用不同小写字表示差异显著。

表 3 DNA 片段克隆引物序列

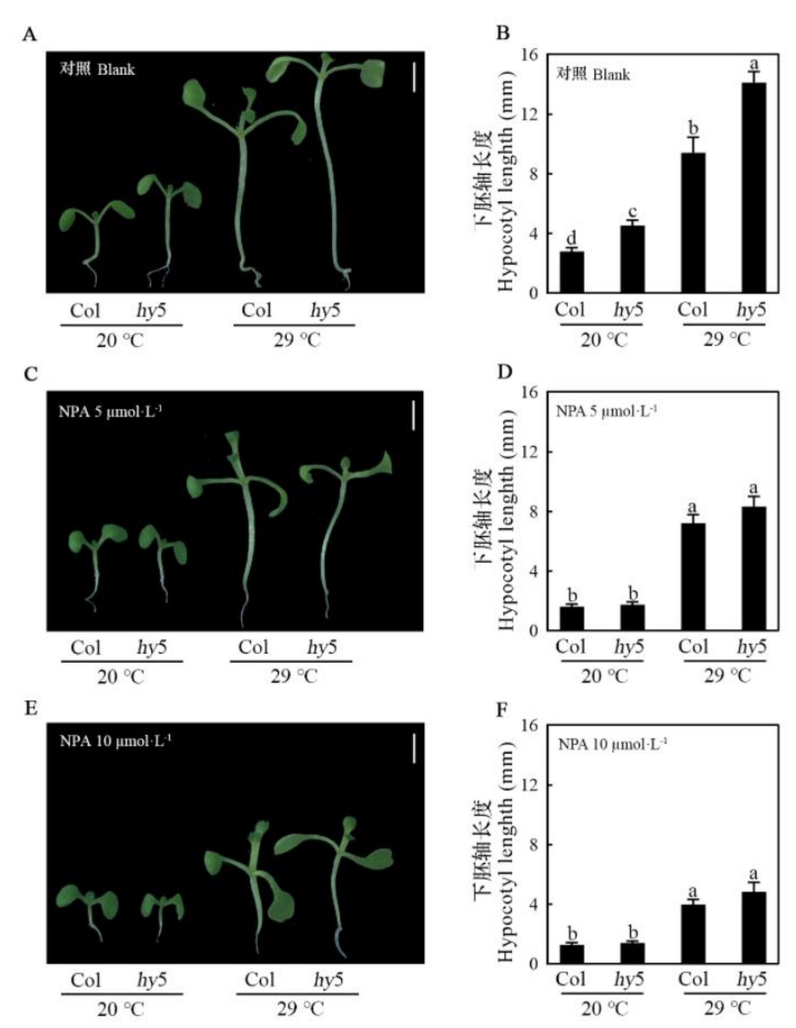
Table 3 The primer sequences used for DNA fragment cloning

引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）	引物 Primer	序列（5′→3′） Sequence（5′→3′）
*HY*5-F	GAATTCATGCAGGAACAAGCGAC	*pSAUR*2-R	GGATCCATCTATCTTTCAAATGAAC
*HY*5-R	CTCGAGCTAGACTCGTAAATGTG	*pSAUR*3-F	CTCGAGTGGAACAAAGGATGGT
*pSAUR*1-F	CTCGAGCTCCATTATGTCAATAG	*pSAUR*3-R	GGATCCGTCTTCTTATTTATGTTTG
*pSAUR*1-R	GGATCCCTTTGAGGACTAATGC	*pSAUR*4-F	CTCGAGCATTGAGGAACGCATTA
*pSAUR*2-F	CTCGAGGGAACCACAAACCTCTTC	*pSAUR*4-R	GGATCCCTTTAAAAGCAAGAAG

2 结果与分析

2.1 在热形态建成信号转导通路中生长素位于 HY5 的下游

生长素和转录因子 HY5 均调控温和高温诱导的下胚轴伸长（Delker et al., 2014），但二者在热形态建成信号转导通路中的上下游关系尚不清楚。在热形态建成中，生长素在子叶中合成后被运输到下胚轴并促进其伸长。NPA 是生长素运输抑制剂，可抑制生长素由子叶向下胚轴的极性运输。与前人的研究一致（Gray et al., 1998），在 20 ℃和 29 ℃中 NPA 抑制下胚轴伸长（图 1）。值得关注的是，在两种温度条件下 HY5 的下胚轴伸长均被 NPA 处理强烈抑制（图 1）。这说明，在热形态建成信号转导通路中生长素处于 HY5 的下游。



A、**C**、**E**. 标准表型，标尺=2 mm；**B**、**D**、**F**. 量化统计，误差线代表 20 株幼苗的标准误差。植物培养条件：持续白光光照 20 ℃或 29 ℃培养 8 d。不同字母表示样品之间的显著性差异（*P*<0.05），下同。

A,**C**,**E**. Standard phenotype, scale bars = 2 mm; **B**,**D**,**F**. Quantitative statistics of hypocotyl length, error bars indicated the SE of 20 seedlings. The culture conditions of plants are as follows: continuous white light at 20 ℃ or 29 ℃ for 8 d. Different lowercase letters indicate significant differences between samples(*P*<0.05), the same below.

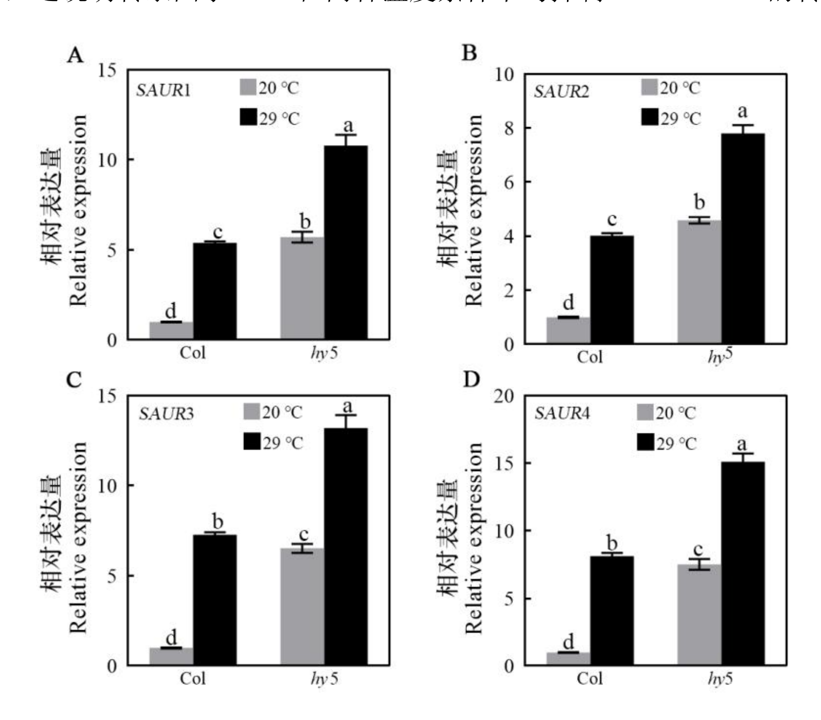
图 1 HY5 与生长素在热形态建成信号转导通路中的遗传学关系

Fig.1 The genetic relationship between HY5 and auxin in thermomorphogenetic signaling pathway

2.2 HY5 调控 *SAUR*1/2/3/4 的表达

我们检测了 HY5 是否调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录。与该实验室同时进行的另一项研究一致的是，在 Col 幼苗中温和高温促进 *SAUR*1/2/3/4 的转录（图 2）。在 20 ℃和 29 ℃中 *hy*5 的 *SAUR*1/2/3/4 转录本丰度明

显高于 Col（图 2），这说明转录因子 HY5 在两种温度条件中均抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录。



A. *SAUR*1 在 Col 和 *hy*5 中的表达量；**B**. *SAUR*2 在 Col 和 *hy*5 中的表达量；**C**. *SAUR*3 在 Col 和 *hy*5 中的表达量；**D**. *SAUR*4 在 Col 和 *hy*5 中的表达量。Col-0 和 *hy*5 的培养条件：20 ℃持续光照下培养 6 d 后，分别转入 20 ℃和 29 ℃ 再培养 6 h 后取样。误差线代表 3 个生物学重复的标准误差。

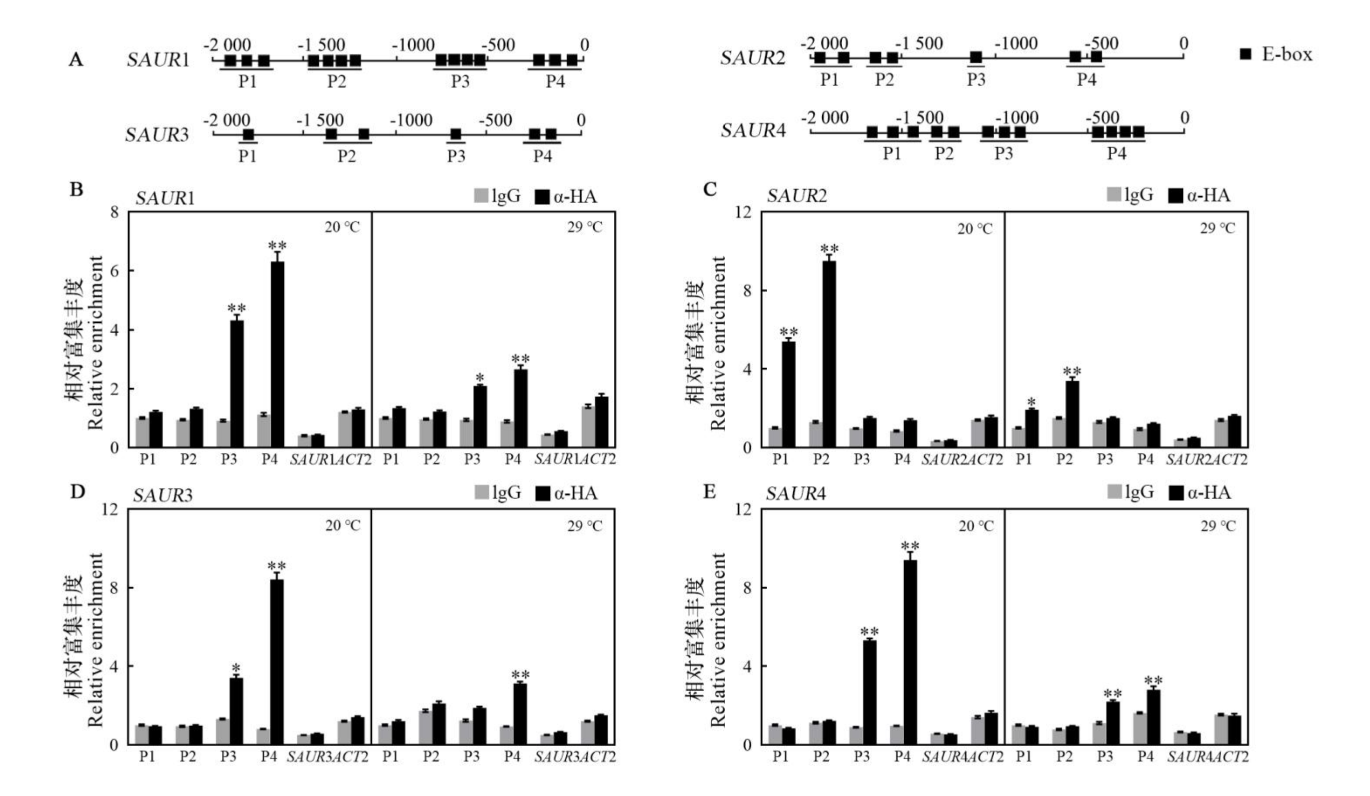
A. The transcript abundance of *SAUR*1 in Col and *hy*5; **B**. The transcript abundance of *SAUR*2 in Col and *hy*5; **C**. The transcript abundance of *SAUR*3 in Col and *hy*5; **D**. The transcript abundance of *SAUR*4 in Col and *hy*5. The culture conditions of Col-0 and *hy*5 are as follows: after 6 d of continuous light culture at 20 ℃, they were transferred to 20 ℃ and 29 ℃, respectively, and then cultured for 6 h before sampling. The error line represents the standard error for the 3 biological replicates.

图 2　HY5 对 *SAUR*1/2/3/4 表达量的影响

Fig.2　Effects of HY5 on the expression of *SAUR*1/2/3/4

2.3　转录因子 HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 的启动子区染色质结合

我们探究了 HY5 能否直接抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录。前人的研究表明，HY5 结合靶基因启动子区的 E-box（CANNTG）顺式作用元件（Leivar & Quail, 2011）。我们发现在 *SAUR*1/2/3/4 的启动子区中分布着大量的 E-box 顺式作用元件（图 3：A）。ChIP 结果显示：富集现象出现在 *SAUR*1 启动子的片段 3 和 4（图 3：B）、*SAUR*2 启动子的片段 1 和 2（图 3：C）、*SAUR*3 启动子的片段 4（图 3：D）和 *SAUR*4 启动子的片段 3 和 4（图 3：E）。而且，29 ℃中的富集量明显低于 20℃中的富集量（图 3：B-E）。这表明 HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 启动子区中某些含有 E-box 的染色质区域结合，并且这些结合被温和高温所抑制。



A. E-box 元件在 *SAUR*1/2/3/4 启动子中的分布，以及在 qRT-PCR 中使用的引物（P1、P2、P3 和 P4）；**B**. HY5 结合于 *SAUR*1 的启动子区；**C**. HY5 结合于 *SAUR*2 的启动子区；**D**. HY5 结合于 *SAUR*3 的启动子区；**E**. HY5 结合于 *SAUR*4 的启动子区。Col-0 的培养条件：20 ℃持续光照下培养 6 d 后，分别转入 20 ℃和 29 ℃ 再培养 6 h 后取样。*SAUR*1/2/3/4 为基因编码序列，扩增时使用的是对应的 qRT-PCR 引物。误差线代表 3 个生物学重复的标准误差（**P*<0.05，***P*<0.01），下同。

A. The distribution of E-box elements in *SAUR*1/2/3/4 promoters, and primers used in qRT-PCR (P1, P2, P3, and P4); **B**. HY5 binds to the promotor region of *SAUR*1; **C**. HY5 binds to the promotor region of *SAUR*2; **D**. HY5 binds to the promotor region of *SAUR*3; **E**. HY5 binds to the promotor region of *SAUR*4. The culture condition of Col-0 was as follows: after 6 d of continuous light culture at 20 ℃, they were transferred to 20 ℃ and 29 ℃, respectively, and then cultured for 6 h before sampling. *SAUR*1/2/3/4 are the gene coding sequence and are amplified using the corresponding qRT-PCR primer. Error bars indicated the SE of three biological replicates (**P*<0.05, ***P*<0.01), the same below.

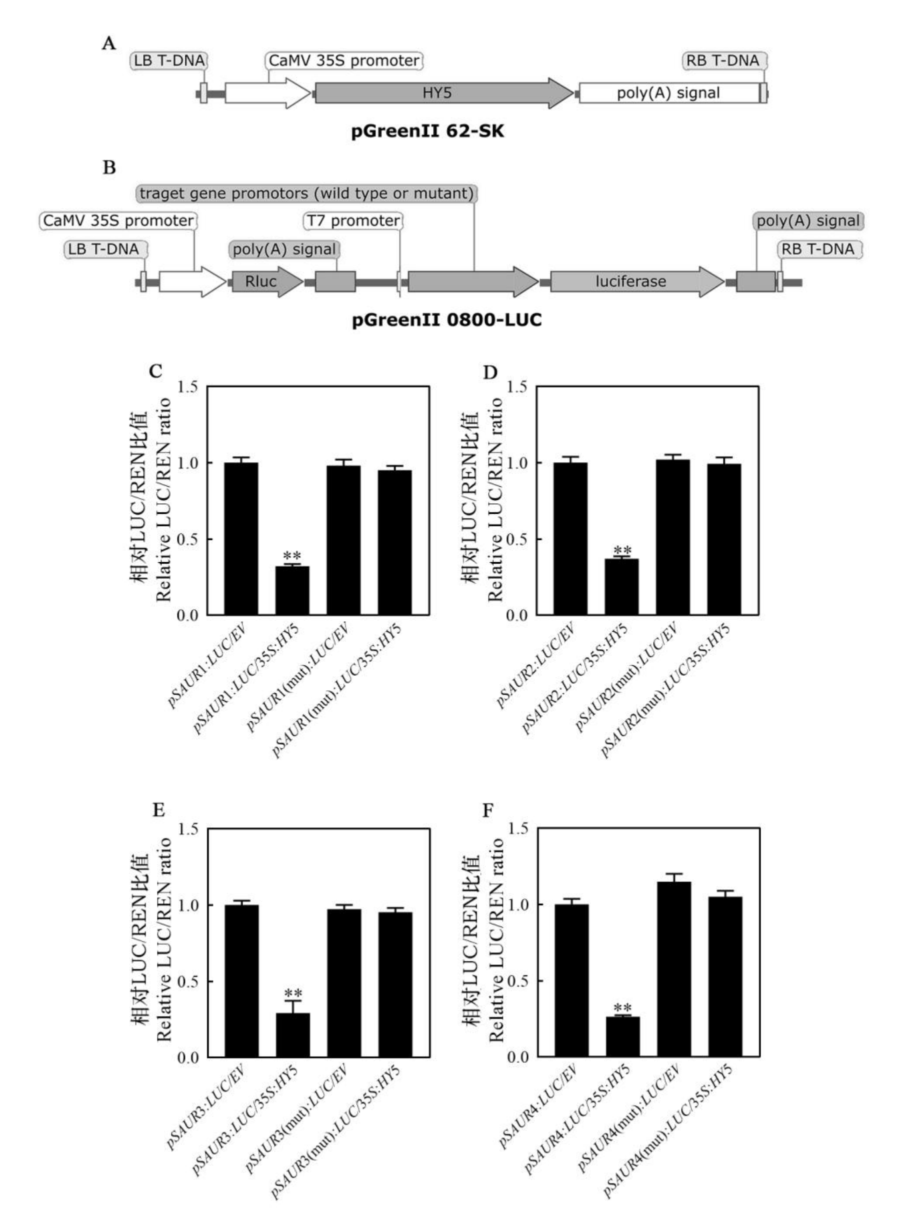
图 3　HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 启动子区染色质的关系

Fig.3　The relationship between HY5 and *SAUR*1/2/3/4 promoter region chromatin

2.4 双荧光素酶报告基因实验中 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 的表达

接下来，我们使用双荧光素酶报告基因实验进一步检测 HY5 是否调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录。在共表达 *ProSAUR*1*p*:*LUC* 和 *Pro*35*S*:*HY*5 的烟草叶片中，LUC 的表达量明显低于共表达 *ProSAUR*1*p*:*LUC* 和空载体的烟草叶片（图 4：C），并且在其余 3 个 *SAUR* 中也观察到了这种现象（图 4：D-F）。这进一步证实了 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录。此外，我们还将 *SAUR*1/2/3/4 启动子中 HY5 结合区域的 E-box 突变，并检测 HY5 是否依然调控突变启动子控制下的报告基因。在共转化 *ProSAUR*1*p*:*LUC*（mut）和 *Pro*35*S*:*HY*5 的烟草叶片中，LUC 的表达量与共表达 *ProSAUR*1*p*:*LUC*（mut）和空载体的相似（图 4：C），在其余三个 *SAUR* 基因中也存在类似现象（图 4：D-F）。这说明，HY5 在抑制 *SAUR*1/2/3/4 转录的过程中需要这些被突变的 E-box 元件。

综合图 2、图 3 和图 4 的结果说明，在常温条件下 HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 的启动子区染色质结合较强，对 *SAUR*1/2/3/4 的转录抑制较强，从而导致这四个基因的表达量较低；当温和高温来临时 HY5 与 *SAUR*1/2/3/4 的启动子区染色质结合减弱，对 *SAUR*1/2/3/4 的转录抑制也减弱，从而导致这四个基因的表达量上升。



A. *HY*5 过表达载体构建；**B**. 目的基因野生型和突变型启动子报告基因载体构建；**C-F**. 多种共转化组合中 LUC 的相对活性。**LB T-DNA**. 左边界；**CaMV 35S promoter**. 花椰菜花叶病毒 35S 启动子；**Rluc**. 内参基因；**luciferase**. 标记基因；**T7 promotor**. 启动子；**polyA**. 多聚腺苷酸；**HY5**. 目标基因；**RB T-DNA**. 右边界；***EV***. 空载体。

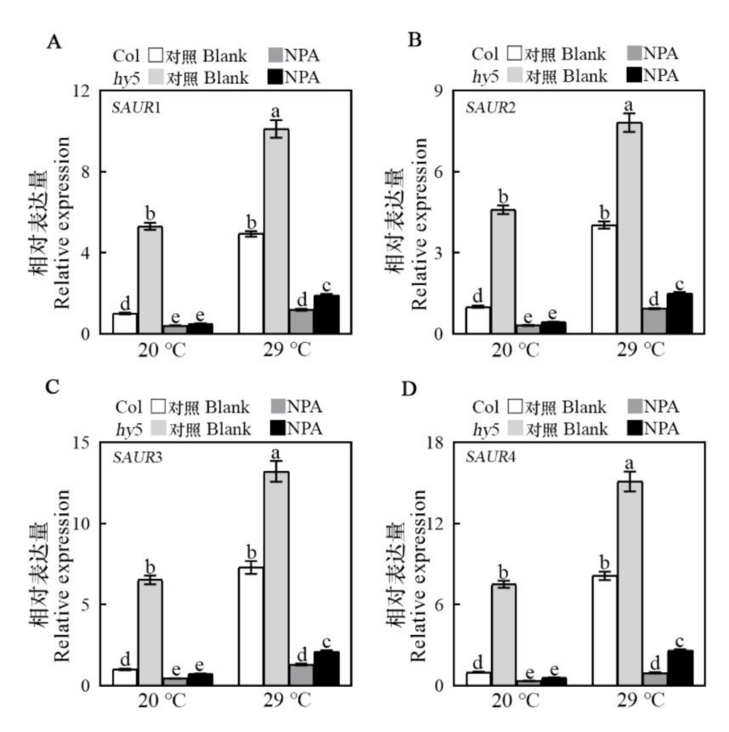
A. The construction of *HY*5 overexpression vector; **B**. The construction of wild type and mutant promotors of target genes; **C-F**. The relative activity of LUC in various cotransformation combinations. **LB T-DNA**. Left border; **CaMV 35S promoter**. Cauliflower Mosaic virus 35S promoter; **Rluc**. Reference gene; **luciferase**. Marker genes; **T7 promotor**. promoter; **polyA**. Polyadenylate; **HY5**. Target gene; **RB T-DNA**. Right border; ***EV***. empty vector.

图 4 在烟草叶片瞬时表达实验中 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 的转录

Fig. 4 HY5 inhibited the transcription of *SAUR*1/2/3/4 in tobacco leaf transient expression experiment

2.5 HY5 在调控 *SAUR*1/2/3/4 表达的过程中依然需要生长素信号转导通路

为了研究 HY5 能否越过整个生长素信号转导通路来直接调控 *SAUR*1/2/3/4 的表达，我们检测了图 1 幼苗中这 4 个基因的转录本水平。如图 5 所示，NPA 抑制了两种温度条件下 Col-0 中 *SAUR*1/2/3/4 的转录，说明我们的药物处理有效。值得注意的是，*hy*5（NPA）中 *SAUR*1/2/3/4 的转录本丰度明显低于 *hy*5，并且与 Col-0（NPA）中的相似，这表明生长素信号转导通路参与了 HY5 对 *SAUR*1/2/3/4 转录的调控。



A. NPA 处理对 *SAUR*1 表达量的影响；**B**. NPA 处理对 *SAUR*2 表达量的影响；**C**. NPA 处理对 *SAUR*3 表达量的影响；**D**. NPA 处理对 *SAUR*4 表达量的影响。植物培养条件：持续白光光照 20 ℃培养 6 d。NPA 的浓度为 10 μmol·L^{-1}。

A. The effect of NPA treatment on *SAUR*1 expression; **B**. The effect of NPA treatment on *SAUR*2 expression; **C**. The effect of NPA treatment on *SAUR*3 expression; **D**. The effect of NPA treatment on *SAUR*4 expression. The culture conditions of plants are as follows: continuous white light at 20 ℃ for 6 d. The concentration of NPA is 10 μmol·L^{-1}.

图 5　NPA 处理对 HY5 调控 *SAUR*1/2/3/4 转录的影响

Fig.5　Effects of NPA treatment on the regulation of *SAUR*1/2/3/4 transcription by HY5

3　讨论与结论

作为促进下胚轴伸长的基因，*SAUR*1/2/3/4 的表达量要适中。因此，植物既需要促进其表达的转录因子，也需要抑制其表达的转录因子。HY5 就发挥着抑制 *SAUR*1/2/3/4 表达的功能。在 20 ℃中，植物需要下胚轴伸长维持在一个较低的水平。该研究表明，20 ℃中 HY5 强烈抑制 *SAUR*1/2/3/4 的表达，使下胚轴伸长基因表达量很低，从而满足了植物对下胚轴生长的需要。在 29 ℃中，植物需要下胚轴剧烈伸长的同时又不能过度伸长，因为这将使植物易于倒伏甚至折断，从而受到严重伤害甚至死亡。该研究表明，29 ℃中 HY5 抑制 *SAUR*1/2/3/4 转录的能力虽被强烈抑制，但并未完全消失。这便使下胚轴伸长基因的表达不过量，从而避免了下胚轴的过度伸长。

植物需要众多细胞伸长基因才能支撑下胚轴的伸长生长，高温诱导的下胚轴伸长也不例外。然而作为热形态建成的重要负向调控因子，HY5 的细胞伸长靶基因却只被发现了 *EXP*8 和 *XTR*7 两个（Gangappa & Kumar, 2017）。该研究发现了新的 HY5 的细胞伸长靶基因，从而进一步完善了 HY5 调控热形态建成的分子机制。

前人的研究表明，热形态建成中 HY5 抑制生长素合成基因 *YUC*8 的转录（Gangappa & Kumar, 2017）。因此，HY5 能够通过调控生长素的合成来影响生长素信号转导通路，最终改变 *SAURs* 的基因转录。但这条信号转导通路的步骤较多，对高温环境的应答时间较长。该文发现了 HY5 还直接调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录。这是一条更短的调控 *SAURs* 的信号转导通路，反应速度更快，可能与前人发现的长信号转导通路相互配合形成互补关系。有趣的是，该研究结果表明此调控过程依然需要生长素，但这并不能否定 HY5 对 *SAUR*1/2/3/4 的直接调控。我们认为这一调控过程可能涉及到了对生长素敏感性的调节。结合该研究和该实验室同时进行的另一项研究，我们发现 HY5 与 PIF4 结合在 *SAUR*1/2/3/4 启动子区染色质的相同部分且

高温抑制前者的结合强度但促进后者的结合强度。此外，HY5 抑制而 PIF4 促进 *SAUR*1/2/3/4 的转录。这说明，HY5 和 PIF4 中任何一个结合能力的增强就可能导致另一个结合能力的减弱，即二者在结合 *SAUR*1/2/3/4 启动子的过程中可能存在竞争关系。前人的研究发现，PIF4 和 ARF6 相互依赖地促进下胚轴伸长相关基因的表达，减弱其中任何一个都会抑制另一个对下胚轴伸长相关基因表达的促进作用，增强其中任何一个也会增强另一个对下胚轴伸长相关基因表达的促进作用（Oh, et al., 2014）。综合以上信息，植物在热形态建成中可能存在如下分子机制：在常温中 HY5 结合 *SAUR*1/2/3/4 启动子区染色质的能力被增强，而 PIF4 的被减弱。PIF4 促进 *SAUR*1/2/3/4 转录的能力便降低了，从而导致 ARF6 促进 *SAUR*1/2/3/4 转录的能力也降低了。这样植物对生长素的敏感性便被降低了。在高温中 HY5 结合 *SAUR*1/2/3/4 启动子区染色质的能力被减弱，而 PIF4 的被增强。PIF4 促进 *SAUR*1/2/3/4 转录的能力便增强了，从而导致 ARF6 促进 *SAUR*1/2/3/4 转录的能力也增强了。这样植物对生长素的敏感性便被提高了。所以，HY5 能够在生长素水平没有提高的条件下，增强生长素促进生长的效应。

这种调控方式的生物学意义可能有以下两点。一、加快植物响应高温的速度。HY5 通过调控生长素合成的方式来调控 *SAURs* 的步骤较多，因此耗时就较长。通过提高生长素敏感性，植物就可以在生长素升高的信号还未传递到的时间段内调控 *SAUR*1/2/3/4 的转录，从而加快应答高温的速度。二、使生长素对下胚轴伸长的促进作用能够持续。如该文前言中所述，高温对生长素合成的促进作用持续的时间较短，高温对下胚轴后续的促进作用可能依赖生长素敏感性的增加（Huai, et al., 2018; Sun, et al., 2012; Pucciariello, et al., 2014）。

通常情况下，该研究需要构建 *hy*5/*saur*1/*saur*2/*saur*3/*saur*4 五重突变体，并观察 *hy*5 的长下胚轴表型是否受到了抑制，但由于各种原因这个实验目前还无法实现。现已筛选出来的 *saur*1、*saur*2 和 *saur*3 单突变体均未在表型层面上观察到与野生型的差异，*saur*4 的单突变体尚未被筛选到。我们构建了 *saur*1/*saur*2/*saur*3 三突变体，这个三突变体也没有热形态建成表型。这很可能是因为 *SAURs* 是一个较大的基因家族，目前已发现的成员超过 70 个，且基因间功能高度冗余。我们也曾计划采用 RNA 干扰技术尽可能多地沉默 *SAUR* 基因，但即使在 *SAUR*1/2/3/4 这四个基因之间，也没找到符合 RNA 干扰技术所需最短长度的同源序列。总体来说，据我们所知目前的技术很难展现出 *SAUR* 基因缺失或下调后的表型，并且也并未检索到关于 *SAUR* 基因缺失或下调后表型的报道。接下来我们又构建了 *hy*5/*saur*1/*saur*2/*saur*3 四重突变体。如我们所预测的一样，此四突变体与 *hy*5 的热形态建成表型没有差别。

植物的信号转导途径是一个复杂的网状结构，在调控同一靶标时往往存在着多条通路，而且通路间还存在着复杂的交织关系。例如在热形态建成中，植物调控 *SAURs* 就极有可能存在着多条相互交织的通路。这些通路各有各的特点，可以相互补充，从而使植物拥有较强的适应高温的能力。基于此我们认为，植物中很可能还存在着其它调控 *SAURs* 的信号转导通路等待着我们去进一步探索。总体来说，该文加深了我们对植物应答高温分子机制的理解，还为目前越来越受到重视的农作物抗热育种增加了潜在的理论依据。

参考文献：

BIANCHIMANO L, DE LUCA MB, BORNIEGO MB, et al., 2023. Temperature regulation of auxin-related gene expression and its implications for plant growth[J]. Journal of Experimental Botany, 74(22): 7015-7033.

CHALLINOR A, WATSON J, LOBELL D, et al., 2014. A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation[J]. Nature Climate Change, 4(3): 287-291.

COX DTC, MACLEAN IMD, GARDNER AS, et al., 2020. Global variation in diurnal asymmetry in temperature, cloud cover, specifc humidity and precipitation and its association with leaf area index[J]. Global Change Biology, 26(12): 7099-7111.

DELKER C, SONNTAG L, JAMES GV, et al., 2014. The DET1-COP1-HY5 pathway constitutes a multipurpose signaling module regulating plant photomorphogenesis and thermomorphogenesis[J]. Cell Reports, 9(6): 1983-1989.

GANGAPPA SN, KUMAR SV, 2017. DET1 and HY5 control PIF4-mediated thermosensory elongation growth

through distinct mechanisms[J]. Cell Reports, 18(2): 344-351.

GRAY WM, ÖSTIN A, SANDBERG G, et al., 1998. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(12): 7197-7202.

HE SL, HSIEH HL, JAUH GY, 2018. SMALL AUXIN UP RNA62/75 are required for the translation of transcripts essential for pollen tube growth[J]. Plant Physiology, 178(2): 626-640.

HUAI JL, ZHANG XY, LI JL, et al., 2018. SEUSS and PIF4 coordinately regulate light and temperature signaling pathways to control plant growth[J]. Molecular Plant, 11(7): 928-942.

ITO J, FUKAKI H, ONODA M, et al., 2016. Auxin-dependent compositional change in Mediator in ARF7- and ARF19- mediated transcription[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(23): 6562-6567.

JI NN, WANG J, ZUO XX, et al., 2021, PpWRKY45 is involved in methyl jasmonate primed disease resistance by enhancing the expression of jasmonate acid biosynthetic and pathogenesis-related genes of peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 172(2): 111390.

JING Y, ZHANG D, WANG X, et al., 2013. Arabidopsis chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation[J]. The Plant Cell, 25(1): 242-256.

KIM S, HWANG G, KIM S, et al., 2020. The epidermis coordinates thermoresponsive growth through the phyB-PIF4-auxin pathway[J]. Nature Communications, 11(1): 1053.

LEE S, WANG W, HUQ E. 2021. Spatial regulation of thermomorphogenesis by HY5 and PIF4 in Arabidopsis[J]. Nature Communications, 12: 3656.

LEIVAR P, QUAIL PH, 2011. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub[J]. Trends in Plant Science, 16(1): 19-28.

MARASCHIN FS, MEMELINK J, OFFRINGA R, 2009. Auxin-induced, SCF(TIR1)- mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation[J]. The Plant Journal, 59(1): 100-109.

OH E, ZHU JY, BAI MY, et al. 2014. Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl[J]. Elife, 3(5): e03031.

PUCCIARIELLO O, LEGRIS M, COSTIGLIOLO RC, et al., 2018. Rewiring of auxin signaling under persistent shade[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(21): 5612-5617.

QUINT M, DELKER C, FRANKLIN KA, et al., 2016. Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis[J]. Nature Plants, 2(1): 15190.

QUINT M, DELKER C, BALASUBRAMANIAN S, et al., 2023. 25 Years of thermomorphogenesis research: Milestones and perspectives[J]. Trends in Plant Science, 28(10): 1098-1100.

REN H, GRAY WM, 2015. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth[J]. Molecular Plant, 8(8): 1153-1164.

ROOSJEN M, PAQUE S, WEIJERS D. 2018. Auxin Response Factors: output control in auxin biology[J]. Journal of Experimental Botany, 69(2): 179-188.

SPARTZ AK, REN H, PARK MY, et al., 2014. SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H^+-ATPases to promote cell expansion in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 26(5): 2129-2142.

SUN JQ, QI LL, LI YN, et al., 2012. PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth[J]. Public Library of Science Genetics, 8(3): e1002594.

WONG JH, KLEJCHOVÁ M, SNIPES SA, et al., 2021. SAUR proteins and PP2C. D phosphatases regulate H^+-ATPases and K^+ channels to control stomatal movements[J]. Plant Physiology, 185(1): 256-273.

ZHU T, VAN ZM, DE SI, 2022. Wandering between hot and cold: temperature dose-dependent responses[J]. Trends in Plant Science, 27(11): 1124-1133.